



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



**Instituto Politécnico
de Coimbra**

Estudo da maturação eritróide com base no CD35 e no CD44 em Síndromes Mielodisplásicas

Raquel Sofia Ladeira Rodrigues

Coimbra

2013



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



**Instituto Politécnico
de Coimbra**

Estudo da maturação eritróide com base no CD35 e no CD44 em Síndromes Mielodisplásicas

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Augusto Paiva, Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra e co-orientação da Mestre Nádía Isabel Almeida Osório, Professora Equiparada a Assistente da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra.

Agradecimentos

À Dr.^a Paula Laranjeira por todo o seu empenho, paciência e estímulo, bem como pela orientação científica e disponibilidade imensa.

Ao Mestre Tiago Carvalheiro pelo apoio, sugestões e auxílio na organização de dados.

Ao Doutor Artur Paiva, orientador da dissertação, pela sua solicitude, compreensão e rigor científico.

À Mestre Nádia Osório pela revisão crítica da tese.

Ao Dr. João Ribeiro pela colaboração e incentivo prestados.

Aos meus pais pelo carinho e compreensão constantes.

À Joana, à Maria José e ao Alain, pelo acolhimento, leituras finais e suporte informático, respectivamente, bem como pela amizade.

Ao Miguel pelo tempo despendido, pelas leituras incansáveis, e por me transmitir a força essencial a acreditar, continuar e terminar.

Por fim, uma última palavra, a todas as restantes pessoas que, de uma forma ou de outra, deram o seu contributo para a realização deste trabalho.

Júri

Especialista em Análises Clínicas e Saúde Pública Fernando José Figueiredo
Agostinho d' Abreu Mendes
Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Doutor José Alberto Órfão de Matos Correia e Vale
Professor Catedrático da Universidade de Salamanca

Doutor Artur Augusto Paiva
Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Mestre Nádia Isabel de Almeida Osório
Professora Equiparada a Assistente da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de
Coimbra

Resumo

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) representam um grupo de doenças clonais da célula pluripotencial hematopoiética caracterizadas por hematopoiese ineficaz e aumento do risco de progressão para Leucemia Mieloblástica Aguda. Considerando que a linha eritróide está muitas vezes afectada em SMD e a avaliação da displasia desta linha representa um desafio na análise imunofenotípica de medulas mielodisplásicas, o objectivo deste trabalho foi estudar a expressão de CD44 e de CD35 na maturação eritróide normal e a forma como essa expressão é afectada em SMD.

Este estudo foi efectuado em 16 amostras de medula óssea (MO) normais/reactivas e em 48 amostras de MO de indivíduos diagnosticados com SMD e sem tratamento. De acordo, com a Organização Mundial de Saúde (OMS) os doentes com SMD foram classificados em CRDM (n=20), AREB-1 (n=15) e AREB-2 (n=13) e de acordo com o *International Prognostic Scoring System* (IPSS) em Baixo risco (n=5), Intermédio-1 (n=8) e Intermédio-2 e Alto risco (n=14). A caracterização imunofenotípica foi efectuada através de um protocolo de imunofluorescência directa de marcação-lise-lavagem, utilizando os anticorpos monoclonais: anti-CD34; anti-HLA-DR; anti-CD117; anti-CD44; anti-CD35; anti-CD45, anti-CD123 e anti-CD133. Para a análise, procedeu-se à identificação e quantificação das células de linha eritróide em MO total e nos diferentes estádios de maturação e à avaliação da expressão de CD44 e de CD35.

Os resultados deste estudo revelaram o CD35 como um marcador precoce na diferenciação eritróide normal e um aumento da expressão de CD44 e da percentagem de eritroblastos em SMD, sendo este aumento mais evidenciado nos estádios mais avançados da doença.

Palavras-chave

Síndrome Mielodisplásica; Citometria de fluxo; Diferenciação eritróide; CD35; CD44

Abstract

Myelodysplastic Syndromes (MDS) are a group of clonal hematopoietic stem cell diseases characterized by ineffective hematopoiesis and increased risk of evolution to Acute Myeloid Leukemia. Considering that the erythroid lineage is often affected in MDS and evaluation of erythroid dysplasia represents a challenge in immunophenotypic analysis of myelodysplastic marrow, the aim of this work was to study the expression of CD44 and CD35 in normal erythroid differentiation and how that expression is affected in MDS.

This study was conducted in 16 normal/reactive bone marrow (BM) samples and 48 BM samples from MDS patients that were not under treatment. According to the World Health Organization (WHO), MDS patients were classified in RCDM (n=20), RAEB-1 (n=15) and RAEB-2 (n=13) and, following the International Prognostic Scoring System (IPSS), in low risk (n=5), intermediate-1 (n=8) and intermediate-2 and high risk (n=14). The immunophenotypic characterization was performed by stain-lyse-and-then-wash direct immunofluorescence protocol, using the following monoclonal antibodies: anti-CD34; anti-HLA-DR; anti-CD117; anti-CD44; anti-CD35; anti-CD45; anti-CD123 and anti-CD133. For analysis, we proceeded to the identification and quantification of erythroid cell lineage in total BM and in different stages of maturation and the evaluation of the expression of CD44 and CD35.

The results of this study revealed that CD35 is an early marker in normal erythroid differentiation and an increase in CD44 expression and the proportion of erythroblasts in MDS. Both alterations are more evident in the advanced stages of disease.

Keywords

Myelodysplastic Syndrome; Flow cytometry; Erythroid differentiation; CD35; CD44

I – Índice

1. Introdução	1
2. Objectivos	7
3. Material e Métodos	9
3.1 População em estudo	9
3.2 Estudo imunofenotípico	9
3.3 Análise estatística	12
4. Resultados	13
4.1 Percentagem de eritoblastos e sua distribuição pelos vários estádios da diferenciação eritróide em MO Normal e SMD	13
4.2 Expressão de CD44 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal e SMD	15
4.3 Expressão de CD35 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal e SMD	18
4.4 Expressão de CD117 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal e SMD	19
4.5 Expressão de CD44, CD35 e CD117 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal, SMD sem anemia e SMD com anemia	22
4.6 Expressão de CD44, CD35 e CD117 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal e SMD associada ou não a displasia eritróide morfológica	23
5. Discussão	25
6. Conclusão	31
7. Referências Bibliográficas	33

II – Lista de Figuras

Figura 1 – Estratégia de identificação dos diferentes estádios da maturação eritróide....	11
Figura 2 – Percentagem de doentes com SMD, agrupados de acordo com a classificação da OMS, que apresentam bloqueios maturativos na linha eritróide nos diferentes estádios da diferenciação.	15
Figura 3 – Expressão de CD44 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal e nos diferentes subgrupos de SMD, de acordo com o sistema de classificação da OMS.	16
Figura 4 – Expressão de CD44 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal e nos diferentes subgrupos de SMD, de acordo com o sistema de classificação IPSS.	17
Figura 5 – Expressão de CD35 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal e nos diferentes subgrupos de SMD, de acordo com o sistema de classificação da OMS.	18
Figura 6 – Expressão de CD35 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal e nos diferentes subgrupos de SMD, de acordo com o sistema de classificação IPSS.	19
Figura 7 – Expressão de CD117 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal e nos diferentes subgrupos de SMD, de acordo com o sistema de classificação da OMS.	20
Figura 8 – Expressão de CD117 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal e nos diferentes subgrupos de SMD, de acordo com o sistema de classificação IPSS.	21
Figura 9 – Expressão de CD44, CD35 e CD117 nos vários estádios da maturação eritróide em MO normal, SMD sem anemia e SMD com anemia.	22
Figura 10 – Expressão de CD44, CD35 e CD117 nos vários estádios da maturação eritróide em MO normal, SMD sem displasia e SMD com displasia eritróide morfológica.	23

III – Lista de Tabelas

Tabela 1 – Entidades das SMD de acordo com a classificação da OMS 2008	2
Tabela 2 – <i>International Prognostic Scoring System (IPSS)</i> para SMD.	3
Tabela 3 – Painel de anticorpos monoclonais utilizados para a caracterização e quantificação dos diferentes estádios da maturação eritróide.	10
Tabela 4 – Percentagem de células de linha eritróide em MO total e distribuição destas pelos diferentes estádios maturativos identificados fenotipicamente, em MO normal e nos diferentes subgrupos de SMD, de acordo com a classificação da OMS.....	13
Tabela 5 – Percentagem de células de linha eritróide em MO total e distribuição destas pelos diferentes estádios maturativos identificados fenotipicamente, em MO normal e nos diferentes subgrupos de SMD, de acordo com a classificação <i>IPSS</i>	14
Tabela 6 – Percentagem de casos de SMD, classificados de acordo com a classificação da OMS, em que a expressão de CD44 está aumentada.	16
Tabela 7 – Percentagem de casos de SMD, classificados de acordo com a classificação <i>IPSS</i> , em que a expressão de CD44 está aumentada.	18
Tabela 8 – Percentagem de casos de SMD, classificados de acordo com a classificação da OMS, em que a expressão de CD117 está aumentada.	20
Tabela 9 – Percentagem de casos de SMD, classificados de acordo com a classificação <i>IPSS</i> , em que a expressão de CD117 está aumentada.	21

IV – Lista de Abreviaturas

APC	Aloficocianina
APCH7	Aloficocianina Hilite 7
AREB-1	Anemia Refractária com Excesso de Blastos 1
AREB-2	Anemia Refractária com Excesso de Blastos 2
ARSA	Anemia Refractária com Sideroblastos em Anel
BFU-E	Unidade Formadora de “ <i>Burst</i> ” Eritróide
CD44H	CD44 hematopoiética
CD44s	CD44 <i>standard</i>
CD44v	CD44 variante
CFU-E	Unidade Formadora de Colônias Eritróides
CFU-GM	Unidade Formadora de Colônias Granulocíticas e Monocíticas
CR1	Receptor do Complemento 1
CRDM	Citopenia Refractária com Displasia Multilinha
CRDU	Citopenia Refractária com Displasia Unilinha
DP	Desvio Padrão
EDTA.K3	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético Tripotássico
FAB	“ <i>French-American-British</i> ”
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FSC	Dispersão frontal da luz
H-CAM	Molécula de adesão celular associada ao homing
IPSS	“ <i>International Prognostic Scoring System</i> ”
IPSS-R	“ <i>Revised – International Prognostic Scoring System</i> ”
LDH	Lactato Desidrogenase
LMA	Leucemia Mieloblástica Aguda
MBL	Lectina Ligadora de Manose
MIF	Média de Intensidade de Fluorescência
MO	Medula Óssea
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	“ <i>Pacific Blue</i> ”
PE	Ficoeritrina
PEcy7	Ficoeritrina cianina 7
PerCPcy5.5	Proteína Clorofila Peridina e Cianina 5.5

Pgp-1	Glicoproteína Fagocítica 1
PO	<i>“Pacific Orange”</i>
RCA	Receptores de Activação do Complemento
SCF	<i>“Stem Cell Factor”</i>
SMD	Síndromes Mielodisplásicas
SPSS	<i>“Statistical Package for the Social Sciences”</i>
SSC	Dispersão lateral da luz

1. Introdução

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) representam um grupo heterogêneo de alterações clonais da célula pluripotencial hematopoiética, caracterizado por citopenia(s), displasia de uma ou mais linhas mielóides, hematopoiese ineficaz e instabilidade genética com aumento do risco de progressão para leucemia mieloblástica aguda (LMA) (1-14).

O mecanismo básico da doença na SMD é, em grande parte, desconhecido. No entanto, várias anomalias citogenéticas que resultam na proliferação clonal neoplásica, acoplada a um aumento da apoptose, desempenham papéis importantes na patogénese desta síndrome (6).

As SMD são, predominantemente, uma doença dos idosos, sendo que o seu risco de desenvolvimento aumenta com a idade (3,15-17). Os dados existentes sugerem que os homens têm uma maior taxa de incidência do que as mulheres, assim como os indivíduos de raça branca em relação a outras raças/etnias (16,17).

De acordo com a sua etiologia, as SMD podem ser classificadas em duas categorias: primárias, isto é, que ocorrem de novo, e secundárias, que ocorrem na sequência de um evento mutagénico. As SMD secundárias estão habitualmente relacionadas com a terapia e são diagnosticadas após exposição a radioterapia ou quimioterapia citotóxica. Contudo, refira-se, o índice de SMD secundárias tem vindo a aumentar devido à crescente incidência de cancro e ao sucesso no tratamento destas doenças (13,15).

As manifestações clínicas das SMD são inespecíficas e variam consideravelmente, dependendo do subtipo e gravidade da(s) citopenia(s), podendo variar entre indolentes a muito graves. A sua investigação diagnóstica é, muitas vezes, desencadeada por sintomas ou sinais sugestivos de citopenias, incluindo fadiga e diminuição da actividade procedente de anemia, febre, tosse, ou choque séptico, resultantes de infecções secundárias a neutropenia e frequentes e inexplicáveis hemorragias ou hematomas consequentes da trombocitopenia. Todavia, muitos dos pacientes são assintomáticos e o seu diagnóstico é efectuado durante a avaliação de outras comorbilidades (15,18).

O primeiro sistema de classificação a ser introduzido para atender à ampla heterogeneidade da SMD foi a classificação *French-American-British* (FAB). Desenvolvida em 1982, esta classificação inclui cinco subtipos da doença, baseada em critérios citomorfológicos (12,13,19).

Actualmente, o sistema de classificação que fornece melhor abordagem diagnóstica da SMD é a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2008

(19). Esta classificação fundamentada no tipo de citopenias, morfologia e anomalias citogenéticas, estabelece os subgrupos da doença que constam da tabela que se segue (16,18-21).

Tabela 1 – Entidades das SMD de acordo com a classificação da OMS 2008

Citopenia Refractária com Displasia Unilinha (CRDU)
Neutropenia Refractária
Anemia Refractária
Trombocitopenia Refractária
Anemia Refractária com Sideroblastos em Anel (ARSA)
Citopenia Refractária com Displasia Multilinha (CRDM)
Anemia Refractária com Excesso de Blastos (AREB)
AREB-1
AREB-2
Síndrome Mielodisplásica com del(5q) isolada
Síndrome Mielodisplásica não Classificável
Síndrome Mielodisplásica da Criança

O prognóstico dos pacientes com SMD é muito heterogéneo, verificando-se a necessidade de desenvolver sistemas que permitam a estratificação de risco e um auxílio na escolha da terapêutica (16).

O *International Prognostic Scoring System (IPSS)*, desenvolvido em 1997, é a ferramenta de estratificação de risco mais frequentemente utilizada (16,22). O *IPSS* apresenta quatro categorias de risco (baixo, intermédio-1, intermédio-2 e alto), baseadas na sobrevivência e risco de progressão para LMA, determinadas através do número de citopenias, das anomalias citogenéticas e da percentagem de blastos na medula óssea (MO) (**Tabela 2**) (1,8,13,15,16,20,22,23). Este sistema é altamente reprodutível e muito simples de usar, no entanto, apresenta várias limitações, uma vez que, sob enfatiza o impacto da citogenética e não é um indicador muito preciso em pacientes de baixo risco (16,20,24).

Tabela 2 – International Prognostic Scoring System (IPSS) para SMD.

Variável	Pontuação			
	0	0,5	1	1,5
Blastos MO%	<5	5-10	-	11-20
Cariótipo	Bom	Intermédio	Mau	-
Citopenias	0-1	2-3	-	-

Adaptado de Greenberg P *et al* (Blood 1997; 89 (6): 2079-2088)

Scores para as categorias de risco: Baixo = 0; Intermédio-1 = 0,5 a 1; Intermédio-2 = 1,5 a 2; Alto = $\geq 2,5$.

Cariótipo:

- Bom: normal: -Y isolada; del(5q) isolada; del(20q) isolada;
- Intermédio: outras alterações;
- Mau: anomalias complexas (≥ 3) ou alterações do cromossoma 7;

Citopenias:

- Hemoglobina <10g/dl;
- Neutrófilos <1,8 x 10⁹/L;
- Plaquetas <100 x 10⁹/L

Uma vez que permanece difícil prever a sobrevivência dos doentes, têm sido propostos vários ajustes ao *IPSS*, nomeadamente a integração dos níveis de lactato desidrogenase (*IPSS* + LDH) e a necessidade de transfusões (OMS + *IPSS*) (13,16,25).

Recentemente, surgiu o *revised IPSS (IPSS-R)*, uma actualização do *IPSS*, que proporciona avanços úteis no prognóstico de doentes com SMD através de cinco categorias de risco (muito baixo; baixo, intermédio, alto e muito alto). Este novo sistema apresenta cinco subgrupos citogenéticos, novos pontos de corte para a profundidade das citopenias e para a percentagem de blastos na MO e a inclusão de diferentes características clínicas, como a idade, *performance status*, ferritina sérica, lactato desidrogenase e β_2 -microglobulina (16,26-28).

A abordagem de diagnóstico para SMD inclui história clínica completa, exclusão de outras causas de citopenia e displasia, características morfológicas das células do sangue periférico e do aspirado da medula óssea (para avaliar a percentagem de blastos e displasia celular), bem como da biópsia óssea (para avaliar a celularidade e topografia da medula), e citogenética (6,15,16,21,29-32). Os critérios mínimos morfológicos para o diagnóstico indicam que, no mínimo, 10% das células de, pelo menos, uma linha mielóide devem demonstrar inequívoca displasia (21). A combinação de displasia da MO e anomalias citogenéticas clonais permite um diagnóstico conclusivo de SMD. No entanto,

apenas 30% a 40% dos casos de SMD apresentam anomalias citogenéticas identificadas, sendo o diagnóstico baseado, em grande parte, em critérios morfológicos, os quais são inerentemente subjectivos, além de muito difíceis em indivíduos que não apresentam critérios morfológicos robustos, como sideroblastos em anel e/ou excesso de blastos (6,29). Por conseguinte, testes adicionais devem ser aplicados para ajudar a estabelecer o diagnóstico de SMD, nomeadamente a citometria de fluxo, teste de Humara, estudo de mutações, testes de unidades formadoras de colónias e *microarrays* (12,18,33).

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é um método preciso para a avaliação quantitativa e qualitativa de células hematopoiéticas (7,18,29), sendo introduzida como um importante co-critério para o diagnóstico de SMD (8,9,11,34).

Nos últimos anos, verificou-se um aumento considerável de estudos que demonstram múltiplas e variáveis anomalias fenotípicas em SMD que podem potencialmente contribuir para o diagnóstico, prognóstico e monitorização da doença (5,6,9,11,12,30,31). As anomalias mais frequentemente reportadas são: aumento do número de mieloblastos, diminuição da granularidade de células mielóides maduras, assincronismos de expressão de marcadores associados a maturação, expressão inapropriada de antígenos linfóides em células mielóides, perda ou diminuição de antígenos mielóides reactivos, diminuição ou ausência dos progenitores de células B, entre outras alterações (12,30,32,34-36).

Muito embora os padrões da citometria de fluxo para o desenvolvimento eritróide normal tenham sido descritos em 1987 (8,37), devido à escassez de anticorpos disponíveis para o estudo desta linhagem, a avaliação da displasia eritróide representa um desafio na análise imunofenotípica de medulas mielodisplásicas (2,7,35).

A eritropoiese é um processo complexo e finamente regulado, compreendendo proliferação e diferenciação de células, que ocorre desde a célula *stem* hematopoiética na MO até aos eritrócitos no sangue periférico (38). A célula *stem* diferencia-se em células formadoras de colónias eritróides [Unidade Formadora de *Burst* Eritróide (BFU-E) e Unidade Formadora de Colónias Eritróides (CFU-E)] que, posteriormente, dão origem ao primeiro precursor morfológicamente diferenciado, o proeritroblasto (39-41). O proeritroblasto, por meio de 3 a 4 mitoses, origina uma série de eritroblastos (basófilos, policromáticos e ortocromáticos, sucessivamente) num processo acompanhado pela diminuição do tamanho da célula, hemoglobinação progressiva, condensação da cromatina e relevantes alterações membranares (39-41). Seguidamente, o eritroblasto ortocromático expelle o núcleo e origina o reticulócito que, inicialmente na MO e

posteriormente no sangue periférico, vai dismantelar a sua maquinaria ribossômica, expulsar organelos e formar o eritrócito maduro – célula anucleada em forma de disco bicôncavo (39,41).

Na citometria, a população eritróide pode ser definida pela perda gradual da expressão de CD45 e pela diminuição dos valores das propriedades de dispersão lateral e frontal da luz (2,8,11,34,42). Os marcadores mais frequentemente utilizados para avaliar a diferenciação eritróide são o receptor da transferrina (CD71) e a glicoforina A (CD235a) (8). O CD71 é um antigénio precoce na maturação eritróide, precede a expressão de CD235a, e permanece no reticulócito até ao instante antes da perda do RNA (2,10,37,42,43). O CD235a surge no proeritroblasto, verificando-se um aumento da expressão na diferenciação do eritroblasto basófilo, e permanece no eritrócito maduro (2,37,42). Refira-se que a endoglina (CD105), o c-Kit (CD117) e o receptor da trombospodina (CD36) também são marcadores úteis para caracterizar as células da linha eritróide (8).

Baseados no conhecimento do padrão normal, vários estudos demonstraram a viabilidade da citometria de fluxo para avaliar a displasia eritróide em SMD (2,7,8,10,29,34). Uma das alterações mais frequentemente encontradas é o aumento do número de progenitores eritróides, associado com uma elevada proporção de células eritróides imaturas CD117⁺ (29,34). No entanto, é de salientar que também se pode verificar uma diminuição dos progenitores, provocada por um aumento de apoptose ou por deficiência de eritropoietina (34). Nas SMD também tem sido reportado, como sinal de displasia eritróide, assincronismo de expressão de CD71 e CD235a, diminuição da expressão de CD71 e de CD36 e aumento da expressão de CD105 (7,10,14,29,34).

É necessário ter em conta que, apesar das várias anomalias fenotípicas referidas não serem específicas de SMD e poderem ser encontradas em condições citopénicas não clonais, estas permitem uma eficiente discriminação entre SMD e MO normal/reactiva (12,30).

O CD44, também conhecido por molécula de adesão celular associada ao *homing* (H-CAM), glicoproteína fagocítica 1 (Pgp-1), Ly-24, Hermes, e HUTCH-1, é uma glicoproteína transmembranar, envolvida nas interações célula-célula e célula-matriz, expressa por uma variedade de células, incluindo fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, células do músculo liso e células hematopoiéticas (44-48). Compreende uma família de receptores heterogéneos, com múltiplas isoformas, codificados por um gene localizado no braço curto do cromossoma 11 (44,47-51). A isoforma mais frequente do CD44, referenciada como CD44H (hematopoiética) ou CD44s (standard), é codificada por

nove exões padrão e corresponde à isoforma mais pequena com um peso molecular de aproximadamente 80 kDa, ao passo que as isoformas variantes (CD44v) são caracterizadas por sequências proteicas adicionais no domínio extracelular da molécula, resultantes dos exões variantes, e têm um padrão de expressão restrito, sendo que algumas apenas são expressas em certas células tumorais (25,48,52-55). Esta heterogeneidade resulta da combinação de *splicing* alternativo e de modificações pós tradução (46,49,50,54,56). O principal ligando do CD44 é o ácido hialurónico, importante componente da matriz extracelular, apresentando, no entanto, outros ligandos, como a fibronectina, o colagénio, a laminina, a osteopontina, entre outros (45,49,51). Esta molécula é um receptor multifuncional envolvido na activação de uma variedade de vias sinalizadoras celulares que regulam a proliferação, sobrevivência, migração e adesão celulares (50,55). Uma vez que todos estes processos, essenciais para as actividades fisiológicas das células normais, estão também envolvidos em actividades patológicas, o CD44 desempenha um indispensável papel em patologias tumorais, estando envolvido na diferenciação celular, invasão e metástase (49,57). Ademais, a sua expressão encontra-se desregulada em neoplasia (44,46,50). Desta forma, o CD44 pode ser um marcador útil no diagnóstico e prognóstico de malignidade e talvez um potencial alvo para a terapia cancerígena (45,46).

No que respeita ao receptor de complemento 1, também conhecido por CR1, CD35 ou receptor C3b/C4b, trata-se de uma glicoproteína transmembranar expressa na maioria das células do sangue periférico, nomeadamente nos eritrócitos (58-60). Pertence à família dos receptores de activação do complemento (RCA) e tem grande afinidade para C1q, C3, C4 e Lectina Ligadora de Manose (MBL) (58,60). A principal função do CD35 é prevenir a deposição de imunocomplexos nas paredes dos vasos sanguíneos, através da ligação do complemento a partículas inflamatórias marcadas, e facilitar a sua depuração (58-61). No entanto, este receptor é ainda responsável por mediar uma variedade de funções moleculares e processos biológicos, nomeadamente na ligação de proteínas, na transdução de sinal, na regulação da actividade enzimática, na activação de receptores e na comunicação e diferenciação celular (60). Alterações de expressão do CD35 nas células sanguíneas têm sido implicadas numa variedade de doenças, designadamente em lúpus eritematoso sistémico, síndrome de imunodeficiência aguda, artrite reumatoide, entre outras, associadas com disfunção do sistema imune, desenvolvimento de inflamação e reacções auto-imunes (58).

2. Objectivos

Caracterizar fenotipicamente os vários estádios da maturação normal da linha eritróide por citometria de fluxo.

Identificar aberrações imunofenotípicas, com base na expressão de CD44 e CD35, em células da linha eritróide na medula óssea de doentes com SMD, relacionando-as com a presença de displasia morfológica e/ou anemia.

Evidenciar o papel da citometria de fluxo no diagnóstico de SMD, relacionando as características fenotípicas com os sistemas de classificação da OMS e *IPSS*.

3. Material e Métodos

3.1 População em estudo

Este estudo foi efectuado em 48 amostras de MO de indivíduos provenientes do Centro Hospitalar Tondela-Viseu, do Hospital Distrital da Figueira da Foz e do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, sendo 24 do sexo feminino e 24 do sexo masculino, com média de idades de $69 \pm 11,3$ anos, diagnosticados com SMD e antes do início do tratamento.

De acordo com o sistema de classificação da OMS, foram estudados 20 indivíduos com CRDM, 15 com AREB-1 e 13 com AREB-2. Através do sistema de classificação *IPSS*, distribuíram-se os doentes por 3 grupos: Baixo risco (n=5), risco Intermédio-1 (n=8), sendo o último grupo constituído por doentes com risco Intermédio-2 e Alto risco (n=14).

Adicionalmente, os doentes foram subdivididos consoante a presença (n=30) ou ausência de anemia (n=16) e a presença (n=15) ou ausência (n=31) de displasia eritróide detectada morfológicamente. Importa salientar que não se obteve qualquer informação a este respeito relativamente a dois doentes estudados.

Para o grupo controlo utilizaram-se 16 amostras de MO normais/reactivas (11 do sexo feminino e 5 do sexo masculino) com média de idades de $63 \pm 14,8$ anos.

Este estudo foi aprovado pelo comité local de ética, tendo sido obtido o consentimento informado de todos os indivíduos estudados.

3.2 Estudo imunofenotípico

A caracterização imunofenotípica da linha eritróide foi efectuada em MO total, colhida em ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico (EDTA.K₃). Após a colheita, as amostras foram armazenadas a 4°C e processadas em menos de 24 horas.

A 100µl de MO (10⁶ células) adicionou-se a seguinte combinação de anticorpos monoclonais: 5µl de anti-CD35 Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), 10µl de anti-CD123 Ficoeritrina (PE), 5µl de anti-CD34 Proteína Clorofila Peridina e Cianina 5.5 (PerCPcy5.5), 2,5µl de anti-CD117 Ficoeritrina Cianina 7 (PEcy7), 10µl de anti-CD133 Aloficocianina (APC), 2,5µl de anti-HLA-DR Aloficocianina *Hilite* 7 (APCH7), 1µl de anti-CD44 *Pacific Blue* (PB) e 2,5µl de anti-CD45 *Pacific Orange* (PO). A informação relativa aos clones e às marcas comerciais dos respectivos anticorpos monoclonais encontra-se

detalhada na **Tabela 3**. Ao que se seguiu uma incubação de 10 minutos à temperatura ambiente e no escuro.

Após o período de incubação, adicionou-se 2 mL de lisante (*FACS Lysing Solution* – BD, San Jose, USA) e procedeu-se a uma nova incubação de 10 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Posteriormente, centrifugou-se durante 5 minutos a 540g, desprezou-se o sobrenadante e procedeu-se a uma lavagem com 1mL de PBS (*Gibco*, - Pasley, Escócia). No final, as células foram ressuspensas em 500µl de PBS.

Tabela 3 – Pannel de anticorpos monoclonais utilizados para a caracterização e quantificação dos diferentes estádios da maturação eritróide.

FITC	PE	PerCPcy5.5	PEcy7	APC	APCH7	PB	PO
CD35 (E11) BD Pharmingen	CD123 (9F5) BD	CD34 (8G12) BD	CD117 (PN IM3698) Beckman Coulter	CD133 (293C3) Miltenyi Biotec	HLA-DR (L243) BD	CD44 (IM7) Biolegend	CD45 (HI30) Invitrogen

Becton Dickinson Biosciences, BD (San Jose, CA, USA); BD Pharmingen (San Diego, CA, USA); Beckman Coulter (Miami, FL, USA); Miltenyi Biotec (Cologne, Germany); Biolegend (San Diego, CA, USA); Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

A aquisição foi efectuada no citómetro de fluxo *FACSCanto II* (BD) através do *software FACSDiva* (BD). Num primeiro passo, procedeu-se à aquisição de todas as células da MO (mínimo: 100.000 eventos); posteriormente, efectuou-se um *gate* onde apenas as células CD34⁺ foram adquiridas, sendo a aquisição sempre superior a 5.000 eventos.

A análise dos resultados foi efectuada utilizando o *software Infinicity* (*Cytognos*, Salamanca, Espanha).

Para a análise de cada caso, procedeu-se à identificação e quantificação das células de linha eritróide em MO total e nos diferentes estádios de maturação. A identificação do precursor mais imaturo desta linha (estádio I) foi feita com base na presença de CD34, HLA-DR e CD117 (marcadores de imaturidade para esta linha hematopoiética), CD35, CD44 e expressão débil de CD45, na ausência de CD123 e CD133. No estágio II da maturação eritróide, as células perderam a expressão de CD34 e HLA-DR, permanecendo ainda positivas para CD117; a expressão de CD44 encontra-se ligeiramente aumentada e a de CD35 e CD45 diminuída, relativamente ao estágio I. O estágio III caracteriza-se pela ausência de CD34, HLA-DR, CD117 e CD45, associada ao aumento da expressão de CD35 e diminuição do CD44. No que respeita ao estágio IV, neste, à semelhança do estágio III, as células são negativas para CD34, HLA-DR, CD117

e CD45; ocorrendo, ainda, uma diminuição da expressão de CD44 e CD35, relativamente ao estágio anterior, que é acompanhada por uma diminuição a nível das propriedades de dispersão lateral (SSC) e frontal da luz (FSC). A estratégia utilizada para a identificação dos diferentes estádios de maturação eritróide encontra-se ilustrada na **figura 1**.

O critério utilizado para a identificação de bloqueio maturativo na linha eritróide foi a percentagem de células em cada estágio ser superior à média + 2 desvios padrão (DP) da percentagem média de células observada nas MO normais.

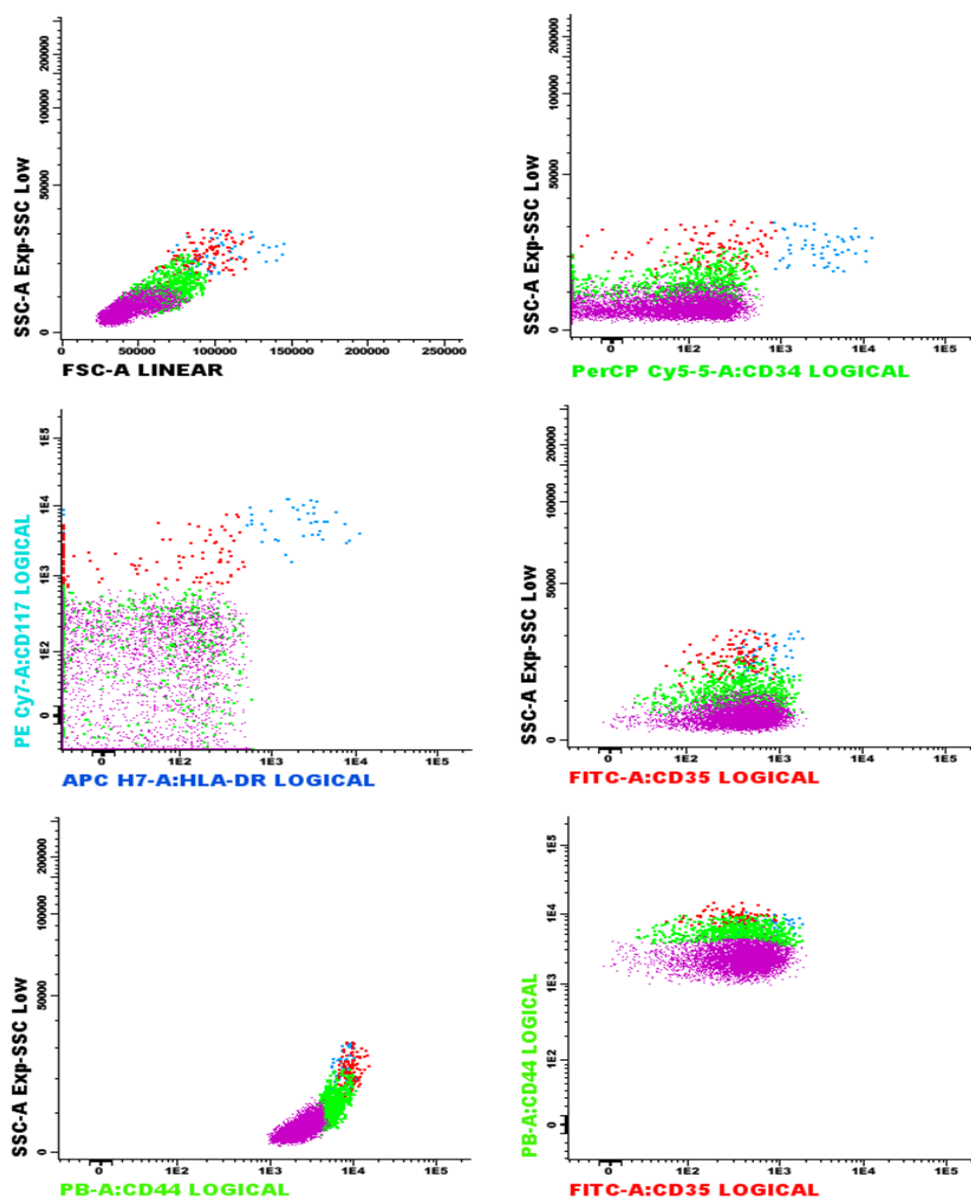


Figura 1 – Estratégia de identificação dos diferentes estádios da maturação eritróide.

Estádio I (azul): CD34⁺/HLA-DR⁺/CD117⁺/CD35⁺⁺/CD44⁺⁺/CD123⁻/CD133⁻/CD45^{+/-}; Estádio II (vermelho): CD34⁻/HLA-DR⁻/CD117⁺/CD35⁺/CD44⁺⁺/CD123⁻/CD133⁻/CD45^{débil}; Estádio III (verde): CD34⁻/HLA-DR⁻/CD117⁻/CD35⁺/CD44^{+intermédio}/CD123⁻/CD133⁻/CD45⁻; Estádio IV (roxo): CD34⁻/HLA-DR⁻/CD117⁻/CD35⁺/CD44^{+débil}/CD123⁻/CD133⁻/CD45⁻/SSC^{baixo}/FSC^{baixo}

3.3 Análise estatística

As variáveis estudadas foram analisadas no *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) statistic 17.0, utilizando o teste *Mann-Whitney*, considerado-se com significado estatístico para $p < 0,05$.

Os resultados são apresentados sob a forma de média \pm dois desvios padrão.

4. Resultados

4.1 Percentagem de eritoblastos e sua distribuição pelos vários estádios da diferenciação eritróide em MO Normal e SMD

No estudo efectuado verificou-se um aumento da percentagem de eritoblastos em SMD, sendo mais evidente em AREB-2, constatando-se uma diferença significativamente estatística entre os grupos Normal e CRDM e Normal e AREB-2 (Tabela 4).

A percentagem de células eritróides no estágio I encontrou-se aumentada em AREB-1, ao passo que a percentagem de células do estágio II se encontrou ligeiramente aumentada em AREB-1 e AREB-2; no entanto estes achados não tiveram significado estatístico. No que diz respeito aos estádios III e IV não se verificou qualquer alteração (Tabela 4).

Tabela 4 – Percentagem de células de linha eritróide em MO total e distribuição destas pelos diferentes estádios maturativos identificados fenotipicamente, em MO normal e nos diferentes subgrupos de SMD, de acordo com a classificação da OMS.

	Normal	CRDM	AREB-1	AREB-2
% Eritoblastos em MO total	11 ± 6,9	17 ± 7,6 ^a	17 ± 8,8	24 ± 12,9 ^b
% Estádio I	0,39 ± 0,20	0,42 ± 0,17	0,57 ± 0,28	0,31 ± 0,36
% Estádio II	2,07 ± 0,63	2,09 ± 0,78	2,69 ± 1,26	3,02 ± 3,28
% Estádio III	12 ± 1,3	11 ± 1,2	12 ± 1,3	11 ± 2,3
% Estádio IV	86 ± 1,5	87 ± 1,6	84 ± 1,6	86 ± 5,5

^a p = 0,046 (Normal vs CRDM)

^b p = 0,005 (Normal vs AREB-2)

De acordo, com a classificação *IPSS*, verificou-se um aumento, com significado estatístico, da percentagem de eritroblastos em MO total em risco Intermédio-1 e Intermédio-2/Alto risco. Relativamente à percentagem de células de linha eritróide nos diferentes estádios, apenas se verificou um aumento do estágio I em Baixo risco e Intermédio-1 e um ligeiro aumento do estágio II em risco Intermédio-1 e Intermédio-2/Alto risco, sendo que nos restantes não se verificou qualquer alteração (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Percentagem de células de linha eritróide em MO total e distribuição destas pelos diferentes estádios maturativos identificados fenotipicamente, em MO normal e nos diferentes subgrupos de SMD, de acordo com a classificação *IPSS*.

	Normal	Baixo risco	Int-1	Int-2 e Alto risco
% Eritroblastos em MO total	11 ± 6,9	14 ± 7,3	21 ± 7,4 ^a	23 ± 13 ^b
% Estádio I	0,39 ± 0,20	0,50 ± 0,12	0,64 ± 0,35	0,33 ± 0,35
% Estádio II	2,07 ± 0,63	2,19 ± 0,97	2,53 ± 1,31	2,88 ± 3,19
% Estádio III	12 ± 1,3	11 ± 0,8	11 ± 1,6	11 ± 2,2
% Estádio IV	86 ± 1,5	86 ± 0,5	85 ± 2,2	86 ± 5,3

^a p = 0,007 (Normal vs Int-1)

^b p = 0,008 (Normal vs Int-2 e alto risco)

No que diz respeito aos bloqueios maturativos na linha eritróide em SMD, constatou-se que existe uma maior percentagem de casos de bloqueio em AREB-1 e AREB-2 do que em CRDM, verificando-se que os bloqueios maturativos ocorreram com maior frequência a nível do estágio II (**Figura 2**). Recorde-se que se considerou que existia bloqueio maturativo sempre que a percentagem de células em cada estágio fosse superior à percentagem média + 2DP da observada em MO normal.

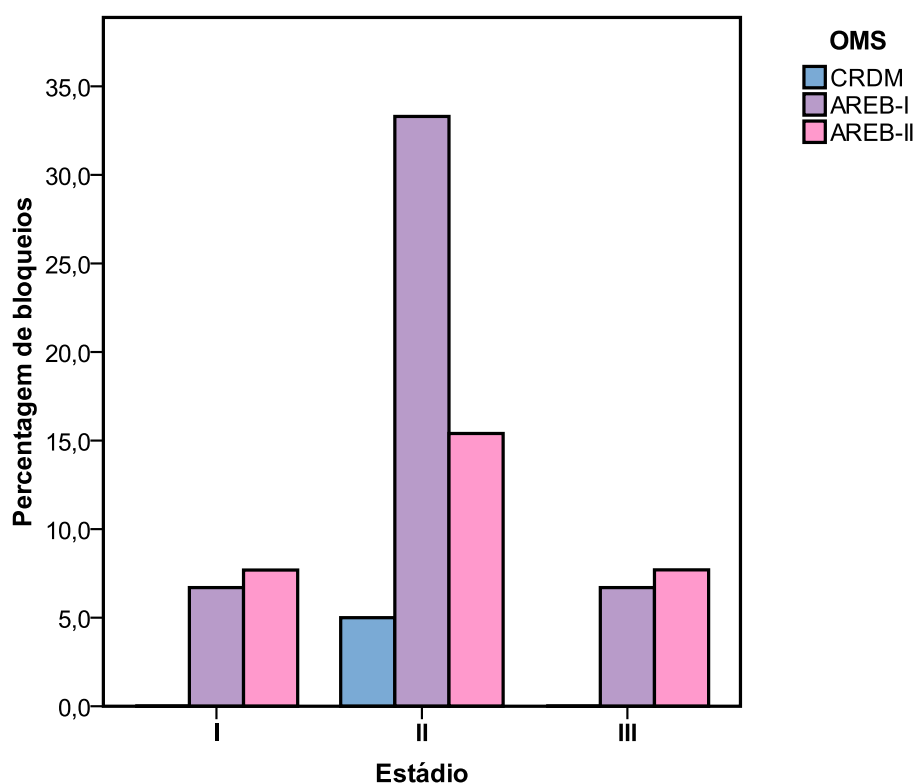
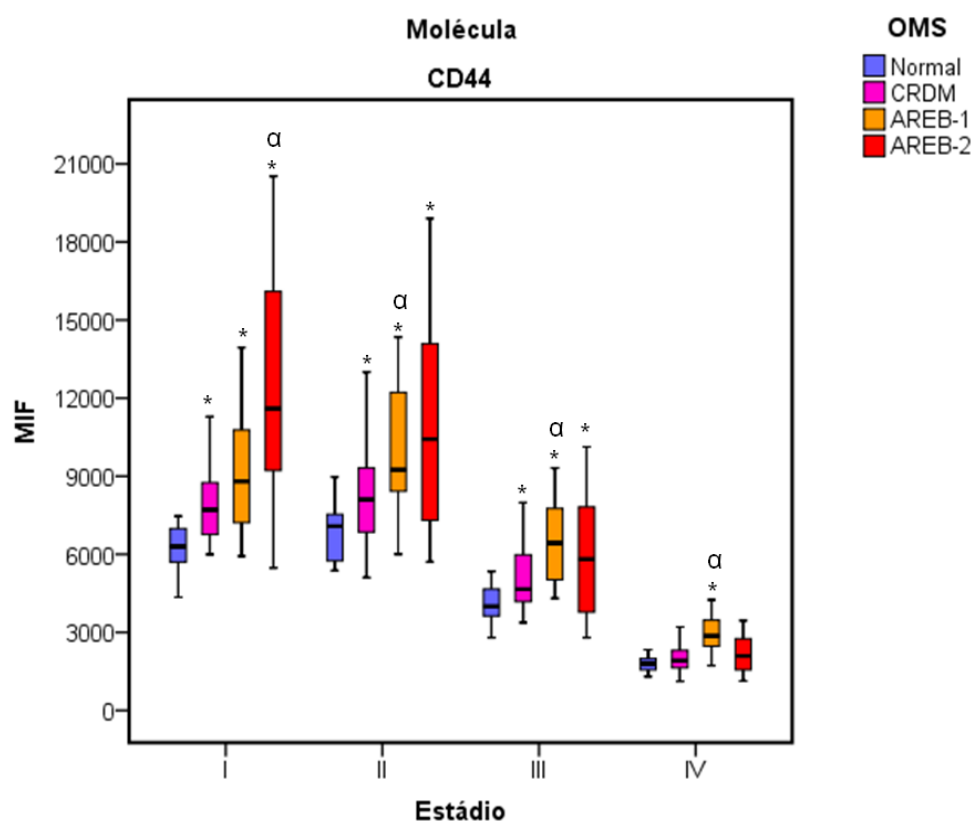


Figura 2 – Percentagem de doentes com SMD, agrupados de acordo com a classificação da OMS, que apresentam bloqueios maturativos na linha eritróide nos diferentes estádios da diferenciação.

4.2 Expressão de CD44 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal e SMD

No estudo da diferenciação eritróide normal verificou-se que a expressão de CD44 aumenta ligeiramente do estágio I para o estágio II, diminuindo continuamente nos restantes estádios maturativos (**Figura 3**).

A expressão de CD44 encontrou-se aumentada em SMD em todos os estádios da maturação eritróide, não se verificando significado estatístico apenas no estágio IV de CRDM e AREB-2. Constatou-se um aumento progressivo, nos estádios I e II, de CRDM para AREB-1 e para AREB-2. Nos estádios III e IV, a expressão de CD44 foi maior em AREB-1 (**Figura 3**).



* $p < 0,05$ em relação ao Normal

α $p < 0,05$ em relação a CRDM

Figura 3 – Expressão de CD44 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal e nos diferentes subgrupos de SMD, de acordo com o sistema de classificação da OMS.

Nos estádios I e II verificou-se que nas formas mais agressivas de SMD existe uma maior percentagem de casos cuja expressão de CD44 se encontrava aumentada. Sendo que, nos estádios III e IV a maior percentagem se encontrou em AREB-1 (**Tabela 6**). Refira-se que, foi considerado aumento da expressão de CD44 sempre que esta fosse superior à média + 2 DP da observada na MO normal.

Tabela 6 – Percentagem de casos de SMD, classificados de acordo com a classificação da OMS, em que a expressão de CD44 está aumentada.

	I	II	III	IV
CRDM	45	30	40	20
AREB-1	53	60	60	80
AREB-2	78	69	54	46

Em relação ao sistema de classificação *IPSS*, não se verificou qualquer alteração da expressão de CD44 entre MO Normal e SMD de Baixo risco. No entanto, em risco Intermédio-1 e Intermédio-2/Alto risco observou-se um aumento da expressão de CD44 em todos os estádios da maturação eritróide, com significado estatístico (**Figura 4**).

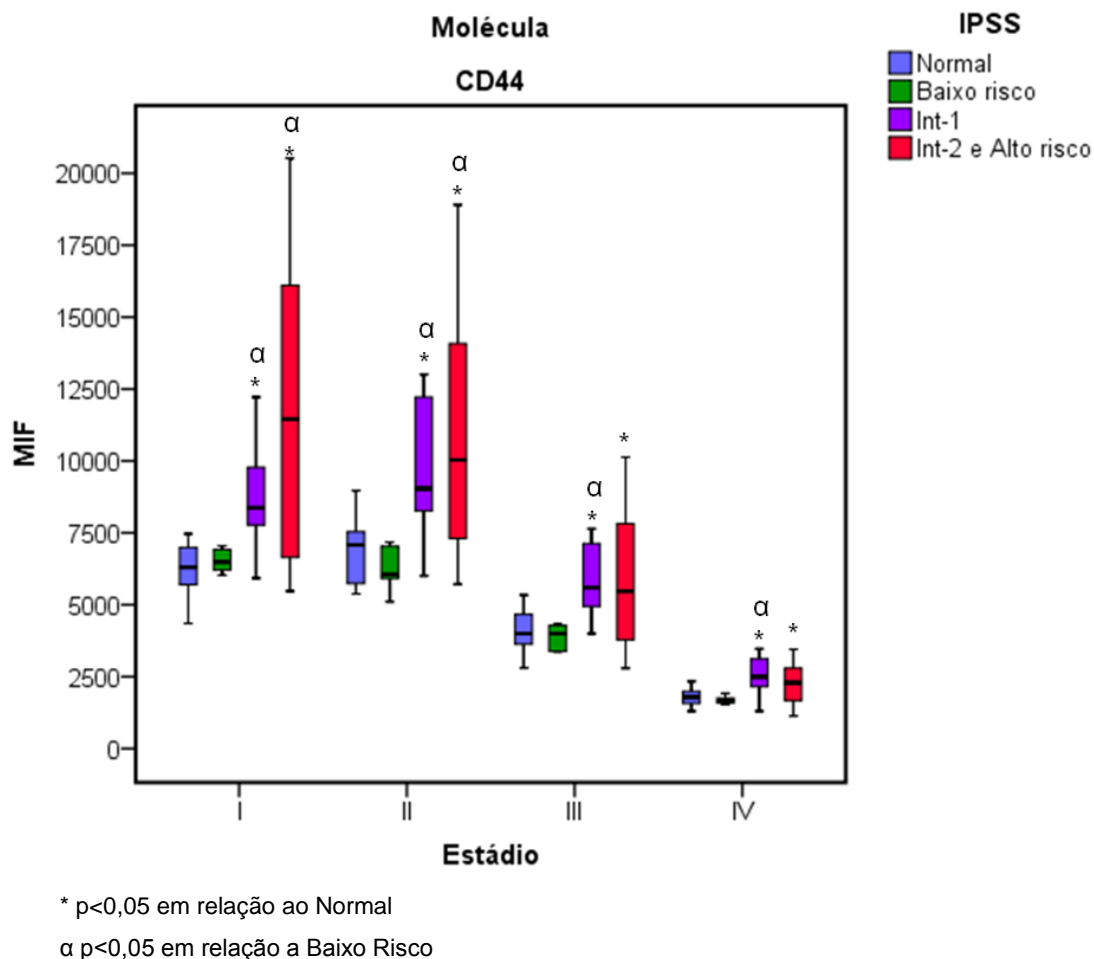


Figura 4 – Expressão de CD44 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal e nos diferentes subgrupos de SMD, de acordo com o sistema de classificação *IPSS*.

Atentando ao sistema de classificação *IPSS*, constatou-se que nenhum caso de Baixo risco apresentou expressão aumentada de CD44. Em relação aos restantes grupos de risco, notou-se uma maior percentagem de casos com expressão aumentada de CD44 nos estádios I e II em Intermédio-2/Alto risco e nos estádios III e IV em Intermédio-1 (**Tabela 7**). Refira-se que, foi considerado aumento da expressão de CD44 sempre que esta fosse superior à média + 2 DP da observada na MO normal.

Tabela 7 – Percentagem de casos de SMD, classificados de acordo com a classificação *IPSS*, em que a expressão de CD44 está aumentada.

	I	II	III	IV
Baixo risco	0	0	0	0
Intermédio-1	50	50	63	63
Intermédio 2/Alto risco	70	71	50	50

4.3 Expressão de CD35 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal e SMD

No que respeita ao CD35, verificou-se que na maturação eritróide normal este é mais expresso no estágio I, diminui para o estágio II, aumenta ligeiramente no estágio III, tornando a diminuir no estágio IV (**Figura 5**).

Relativamente às SMD verificou-se um aumento da expressão de CD35 no estágio I em AREB-1 e AREB-2, tendo apenas significado estatístico em AREB-1 ($p=0,013$). Nos estádios III e IV pareceu existir uma diminuição da expressão de CD35 em AREB-2, sem significado estatístico em relação a Normal (**Figura 5**).

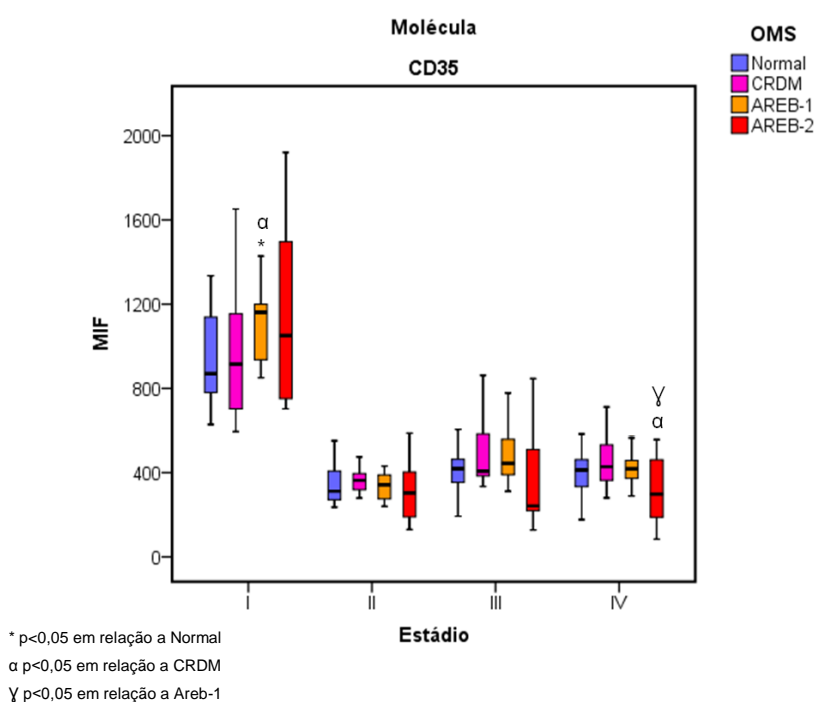


Figura 5 – Expressão de CD35 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal e nos diferentes subgrupos de SMD, de acordo com o sistema de classificação da OMS.

No que concerne ao sistema de classificação *IPSS*, verificou-se um aumento da expressão de CD35 no estágio I em todas as categorias de risco. Por outro lado, nos estádios III e IV verificou-se uma diminuição da expressão do CD35 no grupo que compreende as categorias de risco Intermédio-2 e Alto risco. Importa, no entanto, salientar que estes resultados não tiveram significado estatístico (**Figura 6**).

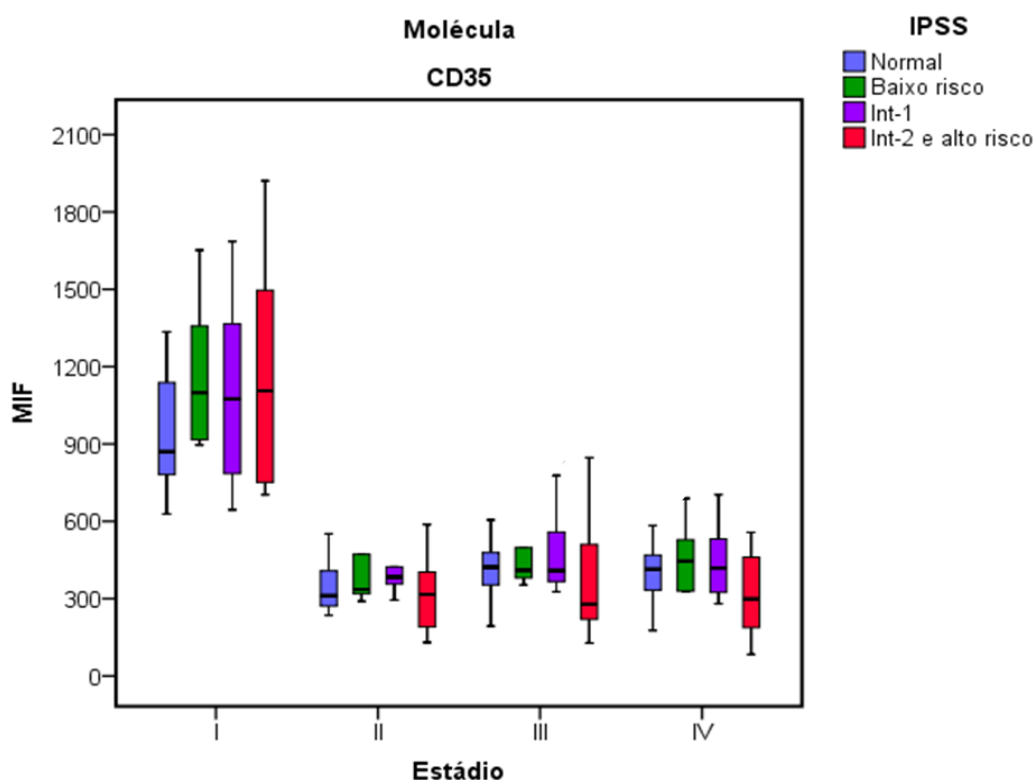


Figura 6 – Expressão de CD35 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal e nos diferentes subgrupos de SMD, de acordo com o sistema de classificação *IPSS*.

4.4 Expressão de CD117 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal e SMD

Na maturação eritróide normal, o CD117 fortemente expresso no estágio I, diminui no estágio II, tornando-se inexistente nos estádios III e IV.

Nas SMD verificou-se um aumento da expressão de CD117 nos estádios I e II em AREB-1 e AREB-2, sendo que este aumento apenas teve significado estatístico no estágio I em AREB-1 ($p=0,004$) (**Figura 7**).

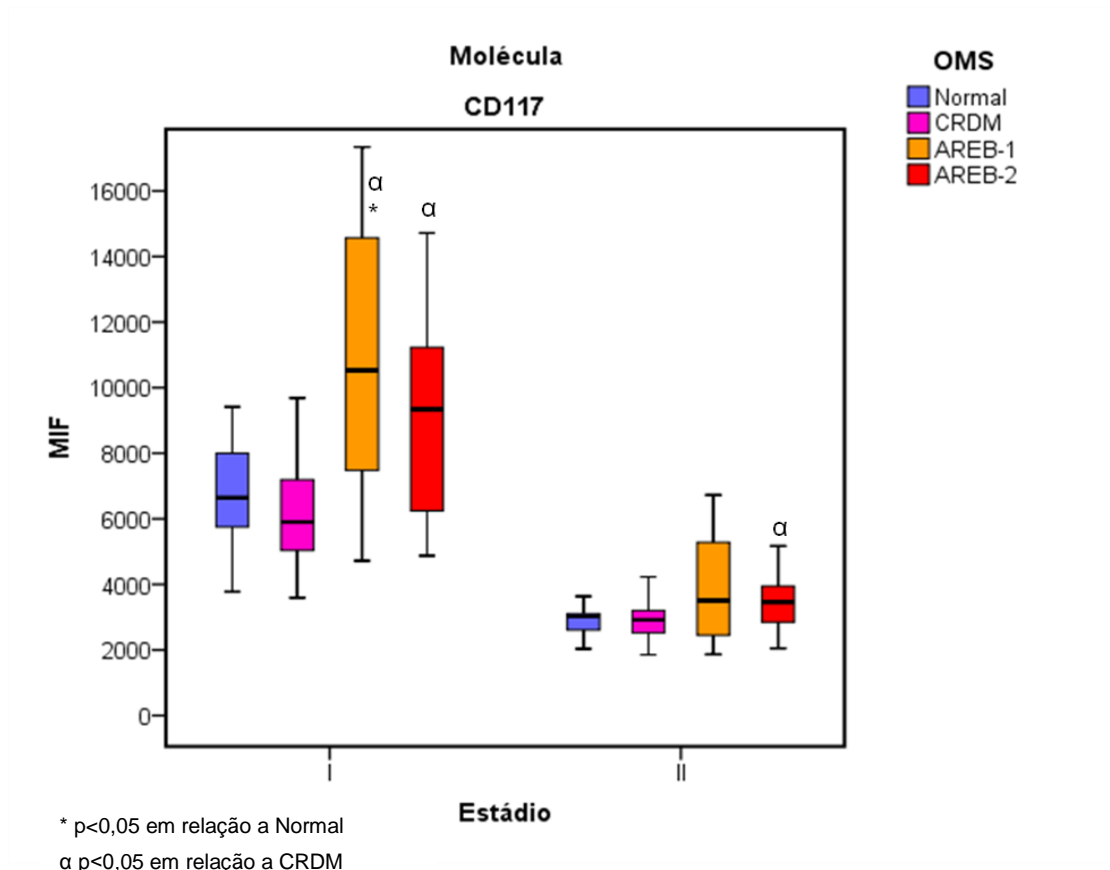


Figura 7 – Expressão de CD117 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal e nos diferentes subgrupos de SMD, de acordo com o sistema de classificação da OMS.

Considerando a classificação da OMS, constatou-se que nenhum caso de CRDM apresentou um aumento da expressão de CD117 e que se verificou uma maior percentagem de casos com aumento da expressão em AREB-1 do que em AREB-2 (**Tabela 8**). Note-se que, foi considerado aumento da expressão de CD117 sempre que esta fosse superior à média + 2 DP da observada na MO normal.

Tabela 8 – Percentagem de casos de SMD, classificados de acordo com a classificação da OMS, em que a expressão de CD117 está aumentada.

	I	II
CRDM	0	0
AREB-1	53	40
AREB-2	33	15

Quanto ao sistema de classificação *IPSS*, a expressão de CD117 aumentou nos estádios I e II nas categorias de risco Intermédio-1 e no grupo que apresenta as categorias Intermédio-2 e Alto risco, verificando-se apenas significado estatístico para Intermédio-1 ($p=0,007$ estágio I e $p=0,014$ estágio II) (**Figura 8**).

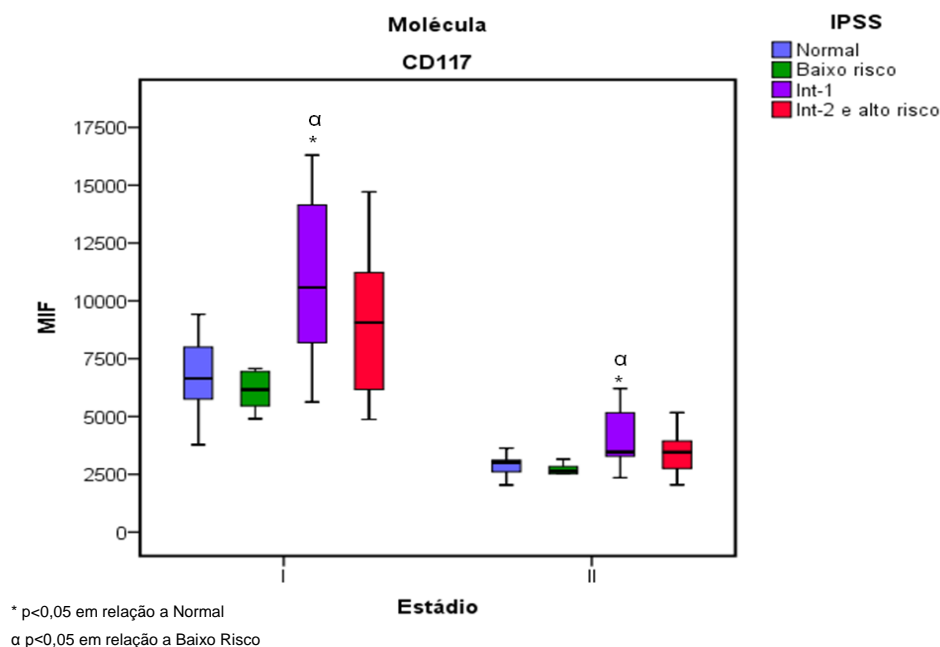


Figura 8 – Expressão de CD117 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal e nos diferentes subgrupos de SMD, de acordo com o sistema de classificação *IPSS*.

De acordo com a classificação *IPSS*, verificou-se a inexistência de casos de Baixo risco com aumento da percentagem de CD117. No que diz respeito aos grupos de risco Intermédio-1 e Intermédio-2/Alto risco, verificou-se uma maior percentagem de casos com aumento da expressão de CD117 em Intermédio-1 (**Tabela 9**). Recorde-se que, foi considerado aumento da expressão de CD117 sempre que esta fosse superior à média + 2 DP da observada na MO normal.

Tabela 9 – Percentagem de casos de SMD, classificados de acordo com a classificação *IPSS*, em que a expressão de CD117 está aumentada.

	I	II
Baixo risco	0	0
Intermédio-1	50	25
Intermédio-2/Alto risco	30	14

4.5 Expressão de CD44, CD35 e CD117 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal, SMD sem anemia e SMD com anemia

De acordo com a **figura 9**, é possível observar um claro aumento da expressão de CD44 em SMD. No entanto, verificou-se que a anemia não tem qualquer repercussão neste aumento, não se verificando alterações da expressão de CD44 na presença ou ausência desta.

A expressão de CD35 parece não apresentar alterações relativamente à ausência ou presença de anemia, sendo apenas de salientar um ligeiro aumento na presença de anemia no estágio I, que não apresentou qualquer significado estatístico (**Figura 9**).

No que respeita ao CD117, constatou-se um aumento da sua expressão em SMD com anemia, apresentando apenas significado estatístico no estágio II, relativamente a Normal ($p=0,040$) e a SMD sem anemia ($p=0,006$) (**Figura 9**).

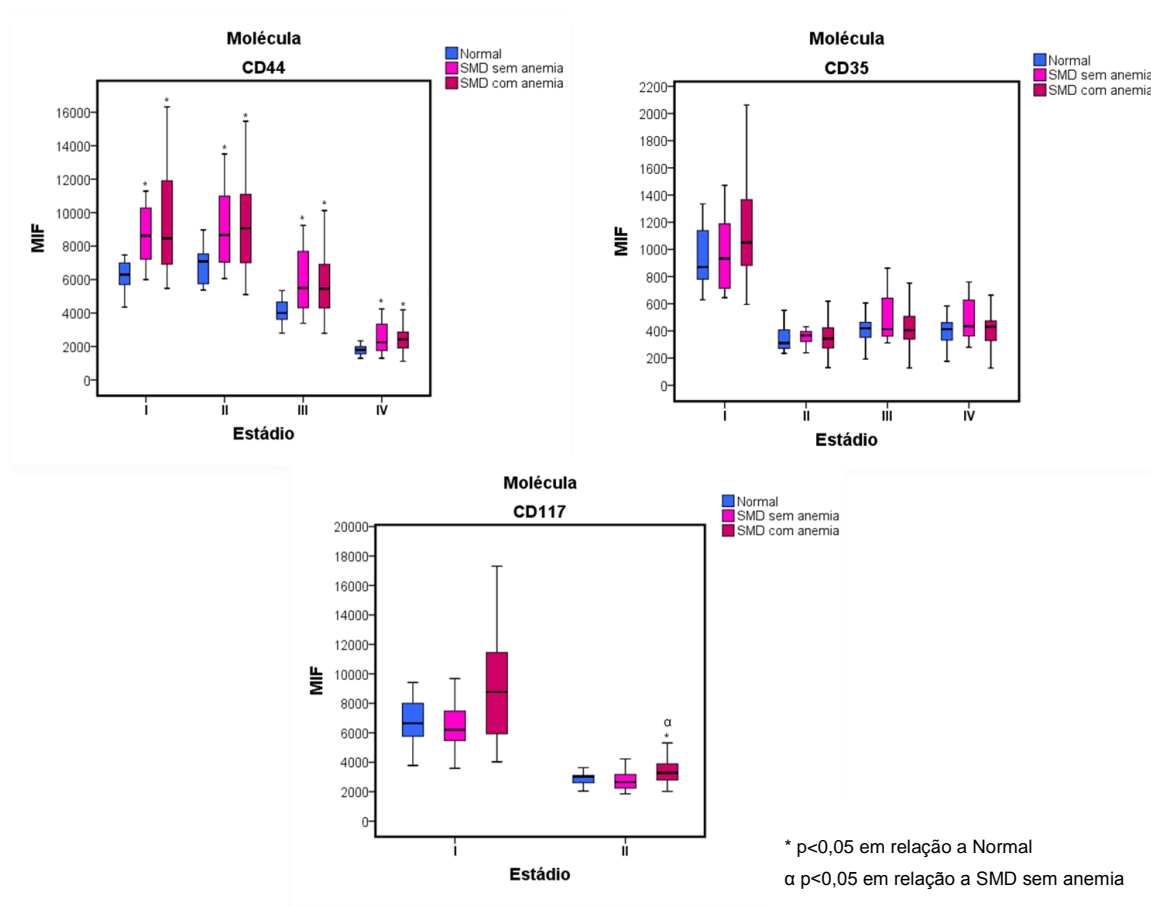


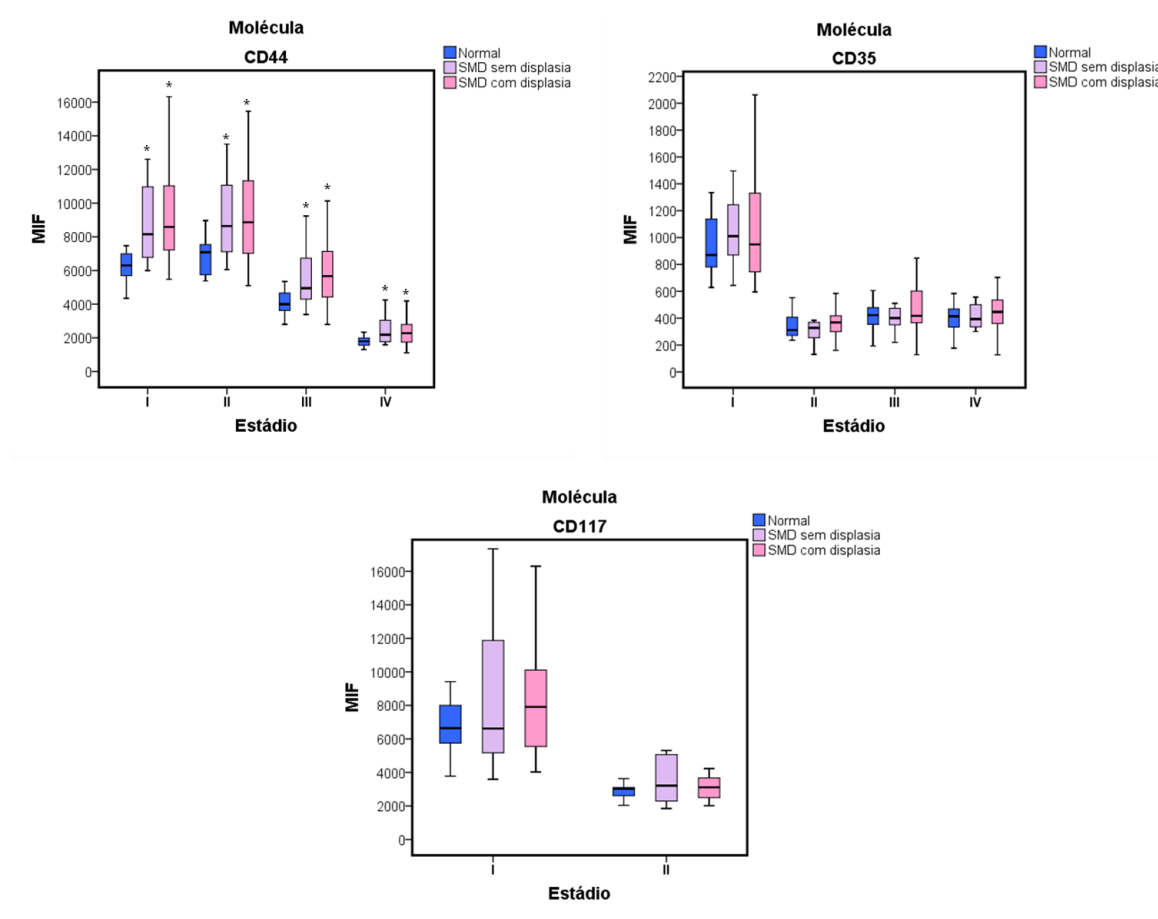
Figura 9 – Expressão de CD44, CD35 e CD117 nos vários estádios da maturação eritróide em MO normal, SMD sem anemia e SMD com anemia.

4.6 Expressão de CD44, CD35 e CD117 nos vários estádios da maturação eritróide em MO Normal e SMD associada ou não a displasia eritróide morfológica

Ao analisar a **figura 10** é possível rever a expressão aumentada de CD44 em SMD. Contudo, parecem não existir alterações de expressão de CD44 entre SMD com displasia e sem displasia eritróide, observada morfológicamente.

Relativamente à expressão de CD35 não se verificou nenhuma associação digna de registo com displasia eritróide morfológica (**Figura 10**).

Apesar de sem significado estatístico, no estágio I verificou-se um ligeiro aumento da expressão de CD117 em SMD com displasia eritróide (**Figura 10**).



* $p < 0,05$ em relação a Normal

Figura 10 – Expressão de CD44, CD35 e CD117 nos vários estádios da maturação eritróide em MO normal, SMD sem displasia e SMD com displasia eritróide morfológica.

5. Discussão

As SMD são um grupo de distúrbios clonais da célula pluripotencial hematopoietica, que frequentemente apresentam uma MO hiperclonal displásica associada a uma hematopoiese ineficiente e citopenias periféricas, devido ao aumento de apoptose e bloqueios maturativos (24,36,62).

Os critérios *standard* para o diagnóstico de SMD são baseados na história clínica, na morfologia das células, na demonstração de anomalias citogenéticas clonais em células hematopoieticas e na exclusão de outras doenças (7,14,18). Contudo, quando a morfologia e a citogenética são inconclusivas, aberrações fenotípicas, determinadas por citometria de fluxo, podem ajudar a estabelecer um diagnóstico (2,7,14,18). Assim, a citometria de fluxo das células da MO foi introduzida como um importante co-critério para o diagnóstico de SMD (8,9,11,34).

Nos últimos anos, tem-se verificado um aumento substancial de estudos que demonstram a ocorrência de múltiplas e variáveis anomalias fenotípicas em SMD (6,9,11,12,30,31). No entanto, na generalidade, estes estudos revelam uma relativa subjectividade e/ou uma análise restrita das populações celulares da MO, verificando-se a necessidade de standardizar e harmonizar metodologias e reagentes (8,12,30,34,63).

Considerando que as SMD compreendem um espectro heterogéneo de anomalias imunofenotípicas e o facto de que a anemia e displasia eritróide estão muitas vezes presentes e proeminentes em SMD, revela-se de extrema importância expandir o restrito painel de anticorpos disponível para o estudo da linha eritróide, contribuindo desta forma para potenciar o papel da citometria de fluxo (30,35).

No presente trabalho, pretendeu-se estudar a maturação eritróide em MO normal/reactiva e em MO de doentes com SMD, com base na introdução de dois novos receptores, o CD44 e CD35.

Os resultados deste estudo permitiram verificar que através da estratégia utilizada é possível identificar células eritróides e reconhecer quatro estádios da diferenciação. O estágio I corresponde às células CD34⁺/HLA-DR⁺/CD117⁺/CD35⁺⁺/CD44⁺⁺/CD123⁻/CD133⁻/CD45^{+/-} e de granularidade intermédia; o estágio II às células CD34⁻/HLA-DR⁻/CD117⁺/CD35⁺/CD44⁺⁺/CD123⁻/CD133⁻/CD45^{débil}; o estágio III às células CD34⁻/HLA-DR⁻/CD117⁻/CD35⁺/CD44^{+intermédio}/CD123⁻/CD133⁻/CD45⁻ e o estágio IV às células CD34⁻/HLA-DR⁻/CD117⁻/CD35⁺/CD44^{+débil}/CD123⁻/CD133⁻/CD45⁻/SSC^{baixo}/FSC^{baixo}. Estes estádios poderão corresponder aos quatro estádios que são identificados convencionalmente por critérios morfológicos: estágio I – pró-eritroblastos; estágio II – eritroblastos basófilos; estágio III – eritroblastos policromáticos; estágio IV – eritroblastos

ortocromáticos. Para garantir a fiabilidade destes marcadores no estudo da diferenciação eritróide, efectuou-se em paralelo uma marcação conjunta com CD44/CD35/CD105/CD117/CD34/CD45/HLA-DR/CD133 verificando-se uma correspondência major nos estádios definidos tendo por base a expressão de CD105. Adicionalmente, foram realizados ensaios clonogénicos, onde se observou que as células de linha eritróide no primeiro estágio de maturação ($CD34^+/HLA-DR^+/CD117^+/CD35^{++}/CD44^{++}/CD123^-/CD133^-/CD45^{+/-}$) estavam divididas em duas populações com base na expressão de CD105, uma $CD105^+$ e outra $CD105^-$. Considerando que a população $CD105^-$ deu origem a 95,3% de colónias BFU-E e 4,7% de Unidade Formadora de Colónias Granulocíticas e Monocíticas (CFU-GM), estes resultados permitem evidenciar, pela primeira vez, o CD35 como um marcador fidedigno e precoce, anterior a CD105, para o estudo da maturação eritróide.

Pela análise dos resultados apresentados, constatou-se um aumento da percentagem de eritroblastos em SMD, que acompanhava a progressão da doença, reflectindo, possivelmente, uma eritropoiese ineficaz e/ou perda de função eritrocitária. O aumento do número de progenitores eritróides associado com uma larga proporção de células eritróides imaturas ($CD117^+$) é descrito por Westers *et al* como uma das alterações mais frequentemente observadas em SMD (34).

Embora sem significado estatístico, verificou-se um aumento da percentagem de células eritróides no estágio I em AREB-1 e nas categorias de risco Baixo e Intermédio-1 e no estágio II em AREB-1 e AREB-2 e nas categorias de risco Intermédio-1 e Intermédio-2/Alto risco. O facto de não se verificar um aumento da percentagem de células no estágio I em AREB-2 e no grupo que compreende as categorias de risco Intermédio-2 e Alto risco resulta, provavelmente, pelo facto de 4 dos 13 doentes com AREB-2 e 4 dos 14 doentes categorizados no grupo Intermédio 2/Alto risco, não apresentarem células $CD34^+$ de linha eritróide, analisados 5000 eventos $CD34^+$. Este aumento de percentagem das células eritróides nos estádios I e II traduz a incapacidade das células sofrerem diferenciação.

De acordo com os resultados apresentados verificou-se um aumento da percentagem de bloqueios eritróides (correspondentes à percentagem de células em cada estágio superior à percentagem média + 2 desvios padrão da observada na MO normal) nas formas mais avançadas da doença, com maior impacto no estágio II, o que revela a perda da capacidade das células para se diferenciarem em células maduras e que poderá estar associado a um maior risco de progressão para LMA. Estes bloqueios têm sido associados a expansão numérica de células com aumento da sobrevivência e

diminuição do sinal apoptótico, que parece reflectir uma diminuição na capacidade de regular a maturação e a proliferação, duas funções celulares intimamente ligadas durante a hematopoiese (24).

O CD44 é uma glicoproteína transmembranar altamente glicosilada com múltiplas isoformas, resultantes de *splicing* alternativo e modificações pós-tradução (56,64). A grande heterogeneidade desta molécula é reflectida na sua capacidade para modular uma variedade de funções celulares, nomeadamente, adesão, proliferação, angiogénese, migração, *homing*, hematopoiese, diferenciação, resposta imune e sobrevivência celular (52,64). Importa evidenciar que desempenha dois papéis fundamentais na hematopoiese que consistem em mediar a interação das células progenitoras com o seu respectivo nicho na MO e em estimular a proliferação e diferenciação celular pela regulação da secreção de citocinas (47,64-66).

Pouco se conhece sobre a importância do CD44 em células eritróides. No entanto, este receptor já foi descrito, por Chen *et al*, como um marcador de superfície, mais fiável do que o CD71, para distinguir os diferentes estádios da maturação eritróide em rato (39).

Devido ao facto do CD44 tomar parte da vasta gama de funções anteriormente referidas, uma expressão desregulada deste pode ser um passo importante para a transformação maligna (64). Por seu turno, vários estudos têm demonstrado uma expressão aberrante das diferentes isoformas de CD44, resultando num curso clínico desfavorável e aumento da capacidade metastática, numa variedade de tumores sólidos (45,49,66,67) e de neoplasias hematológicas, das quais fazem parte a LMA, o linfoma de não-Hodgkin, a leucemia crónica de células B e o mieloma múltiplo (25,52,53,64).

Relativamente às SMD, Karmon *et al* demonstram que numa fase inicial da doença, as células mielóides CD66⁺⁺ da MO revelam uma diminuição significativa da expressão de CD44, enquanto que, numa fase avançada, a sua expressão adquire valores próximos ou acima dos normais, indicando que a expressão desta proteína poderá ser um achado importante para o diagnóstico precoce de SMD (62).

O CD44 pode sofrer processos proteolíticos activos e, subsequentemente, ser libertado como uma molécula solúvel, estando o aumento dos seus níveis no soro associado a mau prognóstico em vários tipos de tumores (25). Estudos anteriores indicam que em SMD se verifica um aumento dos níveis de CD44s solúvel estando correlacionados com diminuição da sobrevivência e reflectindo um significado prognóstico independente do IPSS, mostrando mais uma vez a sua importância na discriminação em SMD de baixo risco (25,68).

Com base nos nossos resultados, foi possível verificar que o CD44 é um marcador de superfície fidedigno para distinguir os diferentes estádios de maturação eritróide e que na maturação eritróide normal os dois primeiros estádios maturativos apresentam uma expressão elevada de CD44, ligeiramente mais forte no estágio II, e que essa expressão vai diminuindo continuamente nos restantes estádios.

Em SMD demonstrou-se um aumento significativo da expressão de CD44 nos diferentes estádios da maturação eritróide, comparativamente ao grupo controlo. Estes resultados sugerem a importância do CD44 na fisiopatologia das SMD. Tendo em conta a importância do CD44 na hematopoiese, pode-se colocar a hipótese que este aumento de expressão confira às células progenitoras eritróides displásicas uma maior adesão ao nicho da MO, condicionando a capacidade de se diferenciarem em eritrócitos maduros.

Ao relacionarmos a expressão de CD44 com os diferentes subgrupos da classificação da OMS para SMD, verificou-se que o aumento da expressão de CD44 acompanha o aumento da progressão da doença, sendo que mais de 50% dos doentes com AREB-1 e AREB-2 apresentam um aumento significativo da expressão de CD44 em todos os estádios de maturação, com excepção do estágio IV em AREB-2. A expressão diferencial nos vários subgrupos da classificação IPSS demonstrou que os doentes com Baixo risco apresentaram valores de expressão próximos dos valores do grupo controlo, verificando-se um aumento significativo da expressão de CD44 nos grupos de risco Intermédio-1 e Intermédio-2/Alto risco. Aproximadamente, 70% dos doentes com risco Intermédio-2/Alto risco apresentaram um aumento significativo da expressão de CD44 nos estádios I e II e 50% nos estádios III e IV. Estas alterações da expressão de CD44 representam uma óbvia displasia eritróide, facilmente detectadas por citometria de fluxo, que podem reflectir a expressão desregulada de vários genes celulares envolvidos durante a progressão da doença (62).

No presente estudo, verificou-se que o CD44 não sofre alterações de expressão quando relacionado com SMD sem e com anemia, nem com SMD com e sem displasia eritróide detectada morfológicamente. Este último achado, permite-nos evidenciar o CD44 como um marcador de superfície relevante para o diagnóstico precoce de SMD, uma vez que sugere a presença de rasgos fenotípicos anteriores a displasia morfológica.

O CD35, mais frequentemente reconhecido por CR1, é um receptor de membrana para C3b e C4b expresso em eritrócitos, leucócitos e células epiteliais glomerulares (69,70). Este receptor desenvolve um papel importante na remoção de imunocomplexos e patogéneos revestidos com C3b e C4b e regula a cascata de complemento por

prevenção da formação de convertases e por actuar como um cofactor do factor I, que medeia a clivagem de C3b e C4b (58,69).

Através do nosso estudo é possível demonstrar a clara utilidade do CD35 para o estudo da diferenciação eritróide, podendo mesmo ser apontado como um dos primeiros antígenos desta diferenciação. De acordo com a análise dos nossos resultados, verificou-se que na maturação eritróide normal a expressão do CD35 oscila, sendo que é mais expresso no estágio I, diminui para o estágio II, aumenta ligeiramente para o estágio III, tornando a decair no estágio IV.

Alterações de expressão do CD35 têm sido implicadas numa variedade de doenças, associadas com disfunção imune, desenvolvimento de inflamação e reacções auto-imunes (58). No que concerne a SMD, com base nos nossos resultados, não se verificaram grandes alterações da expressão do CD35, sendo apenas de salientar um aumento da expressão de CD35 no primeiro estágio da diferenciação eritróide em AREB-1 ($p<0,05$) e AREB-2 e uma diminuição nos estádios III e IV em AREB-2. De acordo com a classificação IPSS, verificou-se um aumento da expressão de CD35 em todas as categorias de risco no estágio I e uma diminuição nos estádios II e III no grupo que compreende as categorias de risco Intermédio-2 e Alto risco. Esta diminuição de expressão de CD35 nos estádios finais da maturação eritróide nas fases mais avançadas da doença pode comprometer a estrutura e consequente funcionalidade dos eritrócitos, promovendo a possível deposição de imunocomplexos, que potencialmente activam o complemento com consequente lesão tecidual.

Relativamente à expressão de CD35 em doentes com SMD com e sem anemia, e com ou sem displasia eritróide, detectada morfológicamente, não se verificam alterações relevantes.

Neste trabalho, seria relevante a análise da expressão de CD35 com o estado auto-imune dos doentes, no entanto, este não foi possível, por falta de realização de estudos associados a auto-imunidade na maioria da população em estudo.

O CD117, também designado c-Kit, é um receptor com actividade tirosina cinase pertencente à subclasse III que se liga a *stem cell factor* (SCF) (71-74). Este receptor tem sido implicado na sobrevivência, auto-renovação e diferenciação das células *stem* hematopoiéticas (75). A expressão do CD117 é geralmente perdida durante a diferenciação das células hematopoiéticas, no entanto, alguns tipos celulares diferenciados, como é o caso dos mastócitos, retêm este receptor (71,75,76).

Os nossos resultados mostram uma forte expressão de CD117 no estágio I, de MO normais/reactivas, que diminui no estágio II e se torna inexistente nos estádios III e IV.

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se um aumento da expressão de CD117 nas formas mais agressivas de SMD. Constatando-se, no entanto, uma maior percentagem de casos com aumento da expressão de CD117 em AREB-1 do que em AREB-2 e em Intermédio-1 do que em Intermédio-2/Alto risco. Importa referir que nenhum caso em CRDM e em Baixo risco apresentou aumento da expressão de CD117.

Estudos anteriores demonstram um aumento da expressão de CD117 em células CD34⁺ imaturas e em mieloblastos em SMD, principalmente em alto risco (36,77). Uma vez que, anomalias da expressão do CD117 também têm sido associadas com o desenvolvimento de LMA, esta alteração de expressão em SMD reflecte a associação desta doença com LMA (77).

De acordo com os nossos resultados, relativamente ao estudo da expressão de CD117 em doentes com SMD com e sem anemia, verificou-se um aumento da expressão de CD117 em doentes com anemia. Estes resultados devem-se, provavelmente, a uma tentativa de compensar a anemia, já que o c-Kit pode activar o receptor da eritropoietina, por induzir a fosforilação dos resíduos tirosina no domínio citoplasmático do mesmo (74,76). Nas SMD com displasia eritróide detectada por morfologia observou-se um ligeiro aumento da expressão de CD117 no estágio I.

6. Conclusão

Com a realização deste estudo podemos concluir que através da marcação de um único tubo (CD34/HLA-DR/CD117/CD44/CD35/CD45/CD123/CD133) é possível, por citometria de fluxo, identificar as células eritróides da MO e distinguir quatro estádios maturativos dentro dessa linha hematopoiética. Verificou-se, também, que o CD35 incorpora novidade, uma vez que se revela um marcador mais precoce do que o CD105 na linha eritróide.

Neste estudo demonstrou-se a ocorrência sistemática do aumento da expressão de CD44 em SMD, que acompanha a progressão da doença, e o seu papel na revelação da existência de displasia fenotípica anterior à morfológica. Adicionalmente demonstrou-se o aumento da percentagem de eritroblastos em SMD, maior nas formas mais graves da doença, e um aumento da expressão de CD117 nas formas avançadas da doença e em SMD associado a anemia. Apesar destas aberrações fenotípicas poderem ser encontradas noutras condições patológicas, é um facto que elas nos permitem uma eficiente discriminação entre SMD e MO normais/reactivas.

Por fim, este estudo permitiu-nos alargar o restrito painel para o estudo da maturação eritróide por citometria de fluxo e evidenciar, mais uma vez, o papel da citometria de fluxo no diagnóstico e prognóstico de doentes com SMD.

No entanto, o estudo carece de uma amostra mais abrangente que permita um maior conhecimento destas características.

7. Referências Bibliográficas

1. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2011;364(26):2496-506.
2. Della Porta MG, Lanza F, Del Vecchio L. Flow cytometry immunophenotyping for the evaluation of bone marrow dysplasia. *Cytometry B Clin Cytom* 2011;80(4):201-11.
3. Kurtin SE, Demakos EP. An update on the treatment of myelodysplastic syndromes. *Clin J Oncol Nurs* 2010;14(3):E29-44.
4. Lyons RM. Myelodysplastic syndromes: therapy and outlook. *Am J Med* 2012;125(7 Suppl):S18-23.
5. Maftoun-Banankhah S, Maleki A, Karandikar NJ, Arbin AA, Fuda FS, Wang HY, et al. Multiparameter flow cytometric analysis reveals low percentage of bone marrow hematogones in myelodysplastic syndromes. *Am J Clin Pathol* 2008;129(2):300-8.
6. Pagnucco G, Giambanco C, Gervasi F. The role of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndromes. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1089:383-94.
7. Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbour N, Xie XY, Molldrem J, Barrett AJ, et al. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood* 2001;98(4):979-87.
8. van de Loosdrecht AA, Alhan C, Bene MC, Della Porta MG, Drager AM, Feuillard J, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2009;94(8):1124-34.
9. van de Loosdrecht AA, Westers TM, Westra AH, Drager AM, van der Velden VH, Ossenkoppele GJ. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood* 2008;111(3):1067-77.

10. Xu F, Wu L, He Q, Zhang Z, Chang C, Li X. Immunophenotypic analysis of erythroid dysplasia and its diagnostic application in myelodysplastic syndromes. *Intern Med J* 2012;42(4):401-11.
11. Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Wells DA. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from a working conference. *Leuk Res* 2008;32(1):5-17.
12. Valent P, Horny HP, Bennett JM, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res* 2007;31(6):727-36.
13. Malcovati L, Nimer SD. Myelodysplastic syndromes: diagnosis and staging. *Cancer Control* 2008;15 Suppl:4-13.
14. Chopra A, Pati H, Mahapatra M, Mishra P, Seth T, Kumar S, et al. Flow cytometry in myelodysplastic syndrome: analysis of diagnostic utility using maturation pattern-based and quantitative approaches. *Ann Hematol* 2012;91(9):1351-62.
15. Foran JM, Shammo JM. Clinical presentation, diagnosis, and prognosis of myelodysplastic syndromes. *Am J Med* 2012;125(7 Suppl):S6-13.
16. Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2012;87(7):692-701.
17. Ma X. Epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Am J Med* 2012;125(7 Suppl):S2-5.
18. Wang SA. Diagnosis of myelodysplastic syndromes in cytopenic patients. *Hematol Oncol Clin North Am* 2011;25(5):1085-110, vii.
19. Cazzola M, Della Porta MG, Travaglino E, Malcovati L. Classification and prognostic evaluation of myelodysplastic syndromes. *Semin Oncol* 2011;38(5):627-34.
20. Ridgeway JA, Fechter L, Murray C, Borrás N. Update on the science of myelodysplastic syndromes. *Clin J Oncol Nurs* 2012;16(0):9-22.

21. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114(5):937-51.
22. Kurtin SE. Myelodysplastic syndromes. *Clin J Oncol Nurs* 2012;16(0):5-7.
23. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89(6):2079-88.
24. Matarraz S, Teodosio C, Fernandez C, Albors M, Jara-Acevedo M, Lopez A, et al. The proliferation index of specific bone marrow cell compartments from myelodysplastic syndromes is associated with the diagnostic and patient outcome. *PLoS One* 2012;7(8):e44321.
25. Loeffler-Ragg J, Germing U, Sperr WR, Herrmann H, Zwierzina H, Valent P, et al. Serum CD44 levels predict survival in patients with low-risk myelodysplastic syndromes. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011;78(2):150-61.
26. Breccia M, Salaroli A, Loglisci G, Alimena G. Revised IPSS (IPSS-R) stratification and outcome of MDS patients treated with azacitidine. *Ann Hematol* 2012.
27. Greenberg PL. Molecular and genetic features of myelodysplastic syndromes. *Int J Lab Hematol* 2012;34(3):215-22.
28. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Sole F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012;120(12):2454-65.
29. Della Porta MG, Malcovati L, Invernizzi R, Travaglino E, Pascutto C, Maffioli M, et al. Flow cytometry evaluation of erythroid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2006;20(4):549-55.
30. Matarraz S, Lopez A, Barrena S, Fernandez C, Jensen E, Flores-Montero J, et al. Bone marrow cells from myelodysplastic syndromes show altered immunophenotypic

profiles that may contribute to the diagnosis and prognostic stratification of the disease: a pilot study on a series of 56 patients. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78(3):154-68.

31. Ogata K, Della Porta MG, Malcovati L, Picone C, Yokose N, Matsuda A, et al. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. *Haematologica* 2009;94(8):1066-74.

32. Ogata K, Kishikawa Y, Satoh C, Tamura H, Dan K, Hayashi A. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood* 2006;108(3):1037-44.

33. Matarraz S, Paiva B, Diez-Campelo M, Corral LL, Perez E, Mateos MV, et al. Myelodysplasia-associated immunophenotypic alterations of bone marrow cells in myeloma: are they present at diagnosis or are they induced by lenalidomide? *Haematologica* 2012;97(10):1608-11.

34. Westers TM, Ireland R, Kern W, Alhan C, Balleisen JS, Bettelheim P, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia* 2012;26(7):1730-41.

35. Wells DA, Benesch M, Loken MR, Vallejo C, Myerson D, Leisenring WM, et al. Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2003;102(1):394-403.

36. Matarraz S, Lopez A, Barrena S, Fernandez C, Jensen E, Flores J, et al. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia* 2008;22(6):1175-83.

37. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development. *Blood* 1987;69(1):255-63.

38. Scicchitano MS, McFarland DC, Tierney LA, Narayanan PK, Schwartz LW. In vitro expansion of human cord blood CD36+ erythroid progenitors: temporal changes in gene and protein expression. *Exp Hematol* 2003;31(9):760-9.
39. Chen K, Liu J, Heck S, Chasis JA, An X, Mohandas N. Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(41):17413-8.
40. Keerthivasan G, Wickrema A, Crispino JD. Erythroblast enucleation. *Stem Cells Int* 2011;2011:139851.
41. Manwani D, Bieker JJ. The erythroblastic island. *Curr Top Dev Biol* 2008;82:23-53.
42. van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;60(1):1-13.
43. Marsee DK, Pinkus GS, Yu H. CD71 (transferrin receptor): an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 2010;134(3):429-35.
44. Iczkowski KA. Cell adhesion molecule CD44: its functional roles in prostate cancer. *Am J Transl Res* 2010;3(1):1-7.
45. Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 1997;71:241-319.
46. Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol* 1999;52(4):189-96.
47. Deguchi T, Komada Y. Homing-associated cell adhesion molecule (H-CAM/CD44) on human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Leuk Lymphoma* 2000;40(1-2):25-37.
48. Ilangumaran S, Borisch B, Hoessli DC. Signal transduction via CD44: role of plasma membrane microdomains. *Leuk Lymphoma* 1999;35(5-6):455-69.

49. Jang BI, Li Y, Graham DY, Cen P. The Role of CD44 in the Pathogenesis, Diagnosis, and Therapy of Gastric Cancer. *Gut and Liver* 2011;5(4):397-405.
50. Olsson E, Honeth G, Bendahl PO, Saal LH, Gruvberger-Saal S, Ringner M, et al. CD44 isoforms are heterogeneously expressed in breast cancer and correlate with tumor subtypes and cancer stem cell markers. *BMC Cancer* 2011;11:418.
51. Naor D, Wallach-Dayana SB, Zahalka MA, Sionov RV. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Semin Cancer Biol* 2008;18(4):260-7.
52. Bendall LJ, Nilsson SK, Khan NI, James A, Bonnet C, Lock RB, et al. Role of CD44 variant exon 6 in acute lymphoblastic leukaemia: association with altered bone marrow localisation and increased tumour burden. *Leukemia* 2004;18(7):1308-11.
53. Legras S, Gunthert U, Stauder R, Curt F, Oliferenko S, Kluin-Nelemans HC, et al. A strong expression of CD44-6v correlates with shorter survival of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 1998;91(9):3401-13.
54. Misra S, Heldin P, Hascall VC, Karamanos NK, Skandalis SS, Markwald RR, et al. Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *FEBS J* 2011;278(9):1429-43.
55. Sackstein R. The biology of CD44 and HCELL in hematopoiesis: the 'step 2-bypass pathway' and other emerging perspectives. *Curr Opin Hematol* 2011;18(4):239-48.
56. Heldin P, Karousou E, Bernert B, Porsch H, Nishitsuka K, Skandalis SS. Importance of hyaluronan-CD44 interactions in inflammation and tumorigenesis. *Connect Tissue Res* 2008;49(3):215-8.
57. Jiang L, Deng J, Zhu X, Zheng J, You Y, Li N, et al. CD44 rs13347 C>T polymorphism predicts breast cancer risk and prognosis in Chinese populations. *Breast Cancer Res* 2012;14(4):R105.

58. Arakelyan A, Zakharyan R, Khoyetsyan A, Poghosyan D, Aroutiounian R, Mrazek F, et al. Functional characterization of the complement receptor type 1 and its circulating ligands in patients with schizophrenia. *BMC Clin Pathol* 2011;11:10.
59. Miyaike J, Iwasaki Y, Takahashi A, Shimomura H, Taniguchi H, Koide N, et al. Regulation of circulating immune complexes by complement receptor type 1 on erythrocytes in chronic viral liver diseases. *Gut* 2002;51(4):591-6.
60. Kullo IJ, Ding K, Shameer K, McCarty CA, Jarvik GP, Denny JC, et al. Complement receptor 1 gene variants are associated with erythrocyte sedimentation rate. *Am J Hum Genet* 2011;89(1):131-8.
61. Glodek AM, Mirchev R, Golan DE, Khoory JA, Burns JM, Shevkoplyas SS, et al. Ligation of complement receptor 1 increases erythrocyte membrane deformability. *Blood* 2010;116(26):6063-71.
62. Karmon Y, Manaster J, Chezard J. Immunophenotypic characterization of myelopoiesis in early and late myelodysplastic syndromes: use of CD44 as an aid in early diagnosis. *Cytometry* 2002;50(4):225-30.
63. De Smet D, Trullemans F, Jochmans K, Renmans W, Smet L, Heylen O, et al. Diagnostic potential of CD34+ cell antigen expression in myelodysplastic syndromes. *Am J Clin Pathol* 2012;138(5):732-43.
64. Hertweck MK, Erdfelder F, Kreuzer KA. CD44 in hematological neoplasias. *Ann Hematol* 2011;90(5):493-508.
65. Legras S, Levesque JP, Charrad R, Morimoto K, Le Bousse C, Clay D, et al. CD44-mediated adhesiveness of human hematopoietic progenitors to hyaluronan is modulated by cytokines. *Blood* 1997;89(6):1905-14.
66. Sneath RJ, Mangham DC. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol* 1998;51(4):191-200.

67. Barbour AP, Reeder JA, Walsh MD, Fawcett J, Antalis TM, Gotley DC. Expression of the CD44v2-10 isoform confers a metastatic phenotype: importance of the heparan sulfate attachment site CD44v3. *Cancer Res* 2003;63(4):887-92.
68. Loeffler-Ragg J, Steurer M, Ulmer H, Skvortsov S, Kircher B, Herold M, et al. Elevated levels of serum CD44 and E-cadherin predict an unfavourable outcome in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2006;20(11):2064-7.
69. Rochowiak A, Niemir ZI. [The role of CR1 complement receptor in pathology]. *Pol Merkur Lekarski* 2010;28(163):84-8.
70. Lach-Trifilieff E, Marfurt J, Schwarz S, Sadallah S, Schifferli JA. Complement receptor 1 (CD35) on human reticulocytes: normal expression in systemic lupus erythematosus and HIV-infected patients. *J Immunol* 1999;162(12):7549-54.
71. Lennartsson J, Jelacic T, Linnekin D, Shivakrupa R. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells* 2005;23(1):16-43.
72. Kent D, Copley M, Benz C, Dykstra B, Bowie M, Eaves C. Regulation of hematopoietic stem cells by the steel factor/KIT signaling pathway. *Clin Cancer Res* 2008;14(7):1926-30.
73. Linnekin D. Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31(10):1053-74.
74. Munugalavadla V, Kapur R. Role of c-Kit and erythropoietin receptor in erythropoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;54(1):63-75.
75. Masson K, Ronnstrand L. Oncogenic signaling from the hematopoietic growth factor receptors c-Kit and Flt3. *Cell Signal* 2009;21(12):1717-26.
76. Lyman SD, Jacobsen SE. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 1998;91(4):1101-34.
77. Pirruccello SJ, Young KH, Aoun P. Myeloblast phenotypic changes in myelodysplasia. CD34 and CD117 expression abnormalities are common. *Am J Clin Pathol* 2006;125(6):884-94.